

**NGHIÊN CỨU GIÁ TRỊ CỦA ĐỘT BIẾN GEN HBX TRONG
TIỀN LƯỢNG UNG THƯ GAN TRÊN BỆNH NHÂN
NHIỄM VIRUT VIÊM GAN B**

Lê Hữu Song và CS*

TÓM TẮT

Nghiên cứu đột biến gen HBX của virut viêm gan B (HBV) trên 190 bệnh nhân (BN) cho thấy: đột biến gen HBX tăng từ nhóm người mang HBV không triệu chứng (NMVR) đến nhóm viêm gan mạn tính (VGM) và cao nhất ở nhóm ung thư gan (UTG). Đột biến gen tại điểm C1653T ở các nhóm NMVR, VGM và UTG lần lượt là 2, 6 và 57,7%; T1753C là 2, 8 và 25,5%; A1762T là 26, 52 và 82,2%; G1764A là 28, 56 và 86,6% và C1766T là 2, 6 và 22,2%. Các đột biến gen này có liên quan đến nguy cơ tiến triển UTG: đột biến điểm C1653T: $p < 0,0001$, OR = 32,8 (95% CI: 10,77 - 130,92); T1753C: $p < 0,001$, OR = 6,5 (95% CI: 2,25 - 22,87); A1762T: $p < 0,0001$, OR = 4,45 (95% CI: 2,34 - 8,5); G1764A: $p < 0,0001$, OR = 4,89 (95% CI: 2,53 - 9,55); C1766T: $p < 0,001$, OR = 6,85 (95% CI: 2,14 - 28,5). Như vậy, các đột biến gen HBX có thể là những dấu ấn giúp tiên lượng UTG.

* Từ khóa: Người mang HBV không triệu chứng; Viêm gan mạn; Ung thư gan; HBX; HBV.

**STUDY ON THE ROLE OF HBX GEN MUTATIONS FOR PROGNOSIS OF
HEPATOCELLULAR CARCINOMA IN PATIENTS INFECTED
WITH HEPATITIS B VIRUS**

SUMMARY

To analyze HBX gen of hepatitis B virus (HBV) in 190 HBV-infected patients showed that the HBX mutation is increasing from asymptomatic chronic HBV carriers (ASY) to chronic B hepatitis (CHB) and highest in hepatocellular carcinoma (HCC) group. Point mutation rate at C1653T in ASY, CHB and HCC is 2, 6 and 57.7%; at T1753C is 2, 8 and 25.5%; at A1762T is 26, 52 and 82.2%; at G1764A is 28, 56 and 86.6%; at C1766T is 2, 6 and 22.2%, respectively. These mutations are associated with the risk of developing HCC: C1653T: $p < 0.0001$, OR = 32.8 (95% CI: 10.77 - 130.92); T1753C: $p < 0.001$, OR = 6.5 (95% CI: 2.25 - 22.87); A1762T: $p < 0.0001$, OR = 4.45 (95% CI: 2.34 - 8.5); G1764A: $p < 0.0001$, OR = 4.89 (95% CI: 2.53 - 9.55); C1766T: $p < 0.001$, OR = 6.85 (95% CI: 2.14 - 28.5). Thus, HBX mutations may be biomarkers for prognosis of HCC in patients infected with HBV.

* *Key words: Asymptomatic chronic HBV carriers; Chronic hepatitis; Hepatocellular carcinoma; HBX; HBV.*

* *Bệnh viện TƯQĐ 108*

*Chịu trách nhiệm nội dung khoa học: GS. TS. Nguyễn Văn Mùi
PGS. TS. Trần Văn Khoa*

ĐẶT VẤN ĐỀ

Ung thư tế bào gan nguyên phát hay ung thư biểu mô tế bào gan (Hepatocellular Carcinoma - HCC) là bệnh lý thường gặp, đứng hàng thứ 5 trên thế giới, có tỷ lệ tử vong đứng hàng thứ 3 trong các tử vong liên quan đến ung thư [1, 2]. UTG thường được chẩn đoán xác định ở giai đoạn muộn khi có triệu chứng như biểu hiện mệt mỏi, đau bụng, gầy sút cân, thậm chí khi đã có khối u khu trú sờ được trên thành bụng, khi có tổn thương tế bào gan hoặc muộn hơn khi không còn khả năng can thiệp phẫu thuật cũng như sử dụng các phương pháp trị liệu khác [3]. Nguyên nhân chẩn đoán UTG muộn là do sự hạn chế về các phương pháp phát hiện hiện nay đang được sử dụng tại các cơ sở y tế bao gồm: khám lâm sàng phát hiện thấy gan to, đau, gầy sút cân nhanh...; xét nghiệm máu phát hiện dấu ấn ung thư: AFP, siêu âm, X quang, nội soi, chụp cắt lớp vi tính (CT-scanner), cộng hưởng từ (Magnetic Resonance Imaging-MRI), sinh thiết gan chẩn đoán mô bệnh học... Tuy nhiên, tất cả các phương pháp trên thường chỉ phát hiện được UTG ở giai đoạn muộn của bệnh. Khi đó, các biện pháp can thiệp điều trị ít mang lại hiệu quả, thời gian sống của BN sau khi chẩn đoán UTG chỉ kéo dài từ 6 tháng đến 1 năm. Vì vậy, nghiên cứu tìm hiểu các dấu ấn sinh học, các biện pháp chẩn đoán mới để phát hiện sớm và tiên lượng UTG là nhu cầu cần thiết hiện nay.

Kết quả nhiều nghiên cứu trước đây đã chứng minh nhiễm HBV là nguyên nhân chủ yếu gây UTG. Tuy nhiên, không phải tất cả BN nhiễm HBV đều tiến triển thành UTG.

Nhiễm HBV có thể gây viêm gan cấp tính tự hồi phục, hoặc tiến triển thành VGM, xơ gan, viêm gan ác tính, hoặc trở thành NMVR [4, 5]. Nguyên nhân dẫn đến sự khác biệt đó vẫn còn nhiều tranh luận. Liên quan đến UTG, người ta thấy rất nhiều BN được phát hiện bệnh một cách tình cờ, nghĩa là UTG thường xuất hiện trên BN trước đây hoàn toàn khỏe mạnh nhưng mang HBV mạn tính không triệu chứng. UTG cũng như tất cả các bệnh ung thư khác nói chung là hậu quả của biến đổi nhiều gen, tương tác qua lại của nhiều protein, ADN trong tế bào. Do đặc điểm bộ gen và vòng đời của HBV có liên quan chặt chẽ đến sự hình thành UTG, việc tìm ra các dấu ấn phân tử của HBV như đột biến gen, mức độ biểu hiện gen HBV và gen người là một trong những hướng nghiên cứu đang rất được quan tâm [4]. Nghiên cứu này được tiến hành nhằm *Xác định tỷ lệ đột biến gen HBX của HBV trên các thể bệnh do nhiễm HBV và tìm hiểu mối liên quan giữa những đột biến gen này với các thể bệnh.*

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu.

190 BN được chia thành 3 nhóm: UTG: 90 BN; VGM: 50 BN; NMVR: 50 BN.

* *Tiêu chuẩn lựa chọn BN:* dựa trên Hướng dẫn chẩn đoán và điều trị viêm gan B của Hội Gan mật Mỹ (2009) [6].

2. Phương pháp nghiên cứu.

Tiến hành đột biến gen HBX theo phương pháp nhân gen, sau đó giải trình tự gen trực tiếp trên hệ thống CEQ8800 (Beckman Coulter, Mỹ). Trình tự mỗi:

HBV_1369 F: 5'-TTTCCATGGCTGC TAGGCTGTACT-3'

HBV_1961R: 5'-AAGGCAAAAACGAGAG TAACTCC-3'.

Sau khi giải trình tự gen, so sánh kết quả với trình tự chuẩn trên ngân hàng dữ liệu theo địa chỉ: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>. Sau đó phân tích trên phần mềm Bioedite 7.05. Định lượng HBV ADN theo phương pháp Real-time PCR theo nguyên lý Taqman prob. Các xét nghiệm HBsAg, HBeAg, anti-HBe, AFP được thực hiện tại Khoa Miễn dịch; tiểu cầu, prothrombin được thực hiện tại Khoa Hóa nghiệm; AST, ALT, bilirubin, protein, albumin được thực hiện tại Khoa Sinh hóa; mô bệnh học được thực hiện tại Khoa Giải phẫu Bệnh lý, Bệnh viện T QĐ 108.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Đặc điểm tuổi, giới.

Bảng 1:

CÁC Ỉ	NMVR (1) (n = 50)	VGM (2) (n = 50)	UTG (3) (n = 90)	p
Giới (nam/nữ)	42/8	38/12	77/13	> 0,05
Tuổi	27,3 ± 8,3	42,5 ± 12,3	55,1 ± 13,2	p _{3-1,2} < 0,05

157 BN nam (82,63%) và 33 BN nữ (17,37%). Tuy nhiên, giữa các nhóm không có sự khác biệt về tỷ lệ nam/nữ. Tuổi ở các nhóm có sự khác biệt, trong đó, nhóm UTG có tuổi cao nhất. Sự khác biệt về tuổi của nhóm này với các nhóm còn lại có ý nghĩa thống kê (p < 0,05).

2. Đặc điểm xét nghiệm cận lâm sàng.

Bảng 2: So sánh một số chỉ số cận lâm sàng thông thường giữa các nhóm.

CÁC CHỈ SỐ	NMVR (1) (n = 50)	VGM (2) (n = 50)	UTG (3) (n = 90)	p
HBsAg (+/-)	50/0	50/0	90/0	KPT
HBeAg (+/-)	28/22	31/19	54/36	> 0,05
Tiểu cầu (g/l)	252 ± 33	243 ± 34	107 ± 34	p _{3-2,1} < 0,01
AST (u/l)	25,44 ± 10,2	251 ± 18,3	110,8 ± 107,4	p _{1-2,3} < 0,01; p ₂₋₃ < 0,05
ALT (u/l)	26,5 ± 7,7	269,1 ± 17,3	100,3 ± 91,9	p _{1-2,3} < 0,01; p ₂₋₃ < 0,05
Bilirubin (μmol/l)	9,8 ± 0,9	42,1 ± 2,9	35,4 ± 15,1	p _{1-2,3} < 0,05
Protein toàn phần (g/l)	78 ± 10	76 ± 10	72 ± 13	> 0,05
Albumin (g/l)	40 ± 3	39 ± 3	35 ± 3	> 0,05
Prothrombin (%)	85 ± 10	80 ± 12	72 ± 10	p _{3-1,2} < 0,05

Không có khác biệt giữa các nhóm về tình trạng mang kháng nguyên e và nồng độ protein toàn phần. Nồng độ AST, ALT tăng cao ở nhóm VGM và UTG, AST/ALT bình thường ở nhóm NMVR, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. Prothrombin giảm thấp ở nhóm UTG so với 2 nhóm còn lại.

3. So sánh nồng độ HBV ADN.

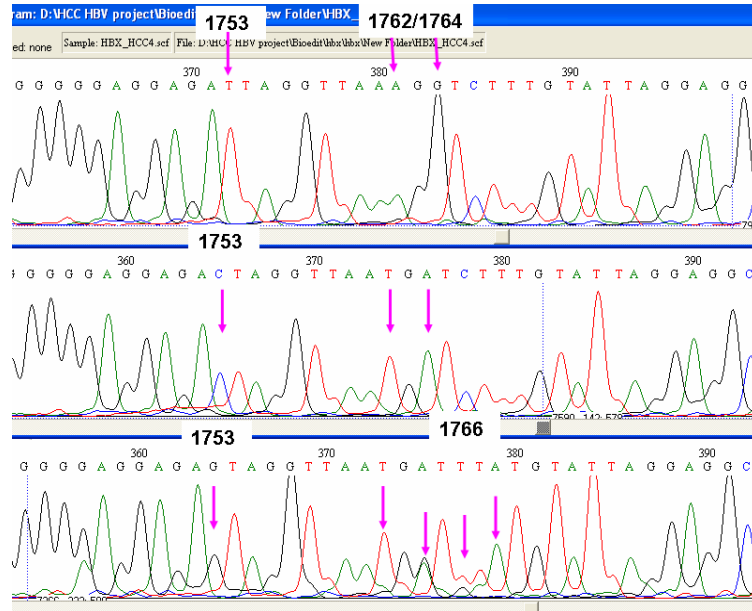
Bảng 3: Nồng độ HBV ADN tại thời điểm nghiên cứu.

NHÓM NGHIÊN CỨU	HBV ADN (copies/ml)		p
	Trung bình	± Độ lệch chuẩn	
NMVR (1)	4,6 x 10 ⁸	9,08 x 10 ⁷	p ₃₋₁ < 0,01
VGM (2)	8,1 x 10 ⁸	1,5 x 10 ⁸	p ₃₋₂ < 0,05
UTG (3)	4,8 x 10 ⁷	1,6 x 10 ⁷	

So với 2 nhóm VGM và NMVR, nhóm UTG có nồng độ HBV ADN thấp hơn có ý nghĩa (p < 0,01 và p < 0,05).

4. Đột biến gen HBX.

* Một số hình ảnh điển hình của đột biến gen HBX:



Đột biến tại 2 điểm thường gặp A1762T/G1764A đồng hợp tử và dị hợp tử. Ngoài ra, còn có một số đột biến khác kết hợp tại các vị trí 1753 (T→C/G, 1766 (C→T).

* So sánh tỷ lệ đột biến gen HBX trên các nhóm nghiên cứu:

Bảng 4: So sánh tỷ lệ đột biến trên các nhóm nghiên cứu.

CÁC LOẠI ĐỘT BIẾN	AXÍT AMIN	TỔNG (n = 190)	NMVR (n = 50) (1)	VGM (n = 50) (2)	UTG (n = 90) (3)	p
C1653T, n (%)	H94Y	73 (38,4)	1 (2)	3 (6)	52 (57,7)	p ₁₋₂ > 0,05; p ₂₋₃ < 0,001 p ₁₋₃ < 0,0001
T1753C, n (%)	I127T	33 (17,4)	1 (2)	4 (8)	23 (25,5)	p ₁₋₂ > 0,05; p ₂₋₃ < 0,001 p ₁₋₃ < 0,001
A1762T, n (%)	K130M	113 (59,47)	13 (26)	26 (52)	74 (82,2)	p ₁₋₂ < 0,01; p ₂₋₃ < 0,001 p ₁₋₃ < 0,0001
G1764A, n (%)	V131I	120 (63,15)	14 (28)	28 (56)	78 (86,6)	p ₁₋₂ < 0,01; p ₂₋₃ < 0,001 p ₁₋₃ < 0,0001
C1766T, n (%)	NC	24 (12,6)	1 (2)	3 (6)	20 (22,2)	p ₁₋₂ > 0,05; p ₂₋₃ < 0,05 p ₁₋₃ < 0,01

Nhìn chung, các đột biến tại gen HBX có xu hướng tăng lên từ nhóm NMVR đến nhóm VGM và tăng cao nhất ở nhóm UTG. Đột biến tại 2 điểm C1653T và T1753C không có khác biệt giữa 2 nhóm NMVR và VGM. Ngoài ra, đều có sự khác biệt giữa các nhóm về đột biến quan tâm.

* So sánh tỷ lệ đột biến trên các nhóm có và không có UTG:

Bảng 5:

CÁC LOẠI ĐỘT BIẾN	KHÔNG UNG THƯ (n = 100) (1)	UNG THƯ (n = 90) (2)	p	OR (95% CI)
C1653T, n (%)	4 (4)	52 (57,7)	< 0,0001	32,8 (10,77 - 130,92)
T1753C, n (%)	5 (5)	23 (25,5)	< 0,001	6,5 (2,25 - 22,87)
A1762T, n (%)	39 (39)	74 (82,2)	< 0,0001	4,45 (2,34 - 8,5)
G1764A, n (%)	42 (42)	78 (86,6)	< 0,0001	4,89 (2,53 - 9,55)
C1766T, n (%)	4 (4)	20 (22,2)	< 0,001	6,85 (2,14 - 28,5)

Nếu gộp chung 2 nhóm NMVR và VGM thành nhóm không ung thư thì càng thấy rõ sự khác biệt về tỷ lệ mang đột biến gen giữa nhóm ung thư và không ung thư. Nguy cơ xuất hiện UTG ở BN mang các đột biến gen này tăng từ 4,45 đến 32,8 lần.

BÀN LUẬN

UTG cũng như tất cả các bệnh ung thư khác nói chung là hậu quả của biến đổi nhiều gen, tương tác qua lại của nhiều protein, ADN trong tế bào. Do đặc điểm bộ gen và vòng đời của HBV có liên quan chặt chẽ đến sự hình thành UTG nên việc tìm ra các dấu ấn phân tử của HBV như đột biến gen, mức độ biểu hiện gen HBV và gen người là một trong những hướng nghiên cứu đang rất được quan tâm [4]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi lựa chọn 2 nhóm BN nhiễm HBV là NMVR và VGM để tìm hiểu các dấu ấn phân tử mới giúp tiên

lượng chẩn đoán sớm UTG. Nhóm UTG trong nghiên cứu này được xem là nhóm chứng dương.

Tương tự như nhiều nghiên cứu trước đây, trong nghiên cứu này, chủ yếu là BN nam (82,63%), chỉ có 17,37% là BN nữ. Tuy nhiên, giữa các nhóm không có sự khác biệt về tỷ lệ nam/nữ. Trong nhiều nghiên cứu trước đây, người ta thấy UTG do nhiễm HBV thường gặp trên BN nam hơn là BN nữ. BN nam thường có nồng độ HBV ADN tăng cao hơn BN nữ, mà HBV ADN là một yếu tố nguy cơ phát triển UTG. Nguyên nhân dẫn đến tình trạng đó đã được nhiều nghiên cứu gần đây chứng minh. Người ta cũng đã xác định được vùng tăng cường I (enhancer I) của HBV là nơi chịu trách nhiệm trong đáp ứng với sự hoạt hóa của thụ cảm thể androgen. Khi gây đột biến khu vực này thì sẽ gây mất ảnh hưởng của thụ thể androgen. Những kết quả đó đã chứng minh dòng tín hiệu qua androgen có thể làm tăng mức độ sao mã của HBV thông qua việc gắn trực tiếp lên các vị trí đáp ứng androgen với vùng tăng cường I của HBV. Kết quả này giải thích nguyên nhân nồng độ HBV ADN tăng cao hơn trên BN nam, qua đó làm tăng nguy cơ của UTG [7]. HBV ADN là một chỉ tiêu rất quan trọng để đánh giá mức độ nhân lên của HBV. Khi nồng độ HBV ADN càng cao, mức độ nhân lên của virus càng lớn. Tuy nhiên, theo diễn biến tự nhiên của bệnh do nhiễm HBV, tùy theo giai đoạn mà mức độ nhân lên của HBV khác nhau. Cụ thể, thông thường trong giai đoạn dung nạp miễn dịch, khi cơ thể chưa nhận biết được sự có mặt của HBV thì HBV nhân lên không bị tác động bởi hệ thống miễn

dịch. Do đó, trong giai đoạn này, nồng độ HBV ADN tăng rất cao. Đến giai đoạn thải loại virus, khi cơ thể chủ nhận biết được virus thì hệ thống miễn dịch được kích hoạt và cơ thể sẽ huy động cả cơ chế miễn dịch dịch thể và miễn dịch tế bào nhằm đào thải virus ra khỏi cơ thể. Quá trình này kèm theo hủy hoại tế bào gan, biểu hiện là hoạt độ enzym ALT tăng cao. Trong nghiên cứu này, so với nhóm UTG, 2 nhóm VGM và NMVR có nồng độ HBV ADN cao hơn có ý nghĩa. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với nhiều nghiên cứu trước đây [8].

Dấu ấn HBV ADN tại thời điểm theo dõi đầu tiên được cho là một yếu tố tiên lượng tốt nhất cho BN VGM ở người lớn. Nồng độ HBV ADN càng cao, tỷ lệ xuất hiện UTG, xơ gan càng lớn sau nhiều năm theo dõi. Nhiều nghiên cứu trước đây cho thấy, sau 13 năm theo dõi, tần suất xuất hiện UTG tăng rõ rệt trên nhóm BN có nồng độ HBV ADN cao, khoảng 14% nếu HBV ADN > 10^6 copies/ml [9]. Nhận định này cũng đúng cho ngay cả khi theo dõi trên NMVR, tức là men gan, chức năng gan hoàn toàn bình thường [10]. Cụ thể, mặc dù AST, ALT hoàn toàn bình thường, nhưng nồng độ HBV ADN càng cao thì nguy cơ UTG càng lớn. Sau 12 năm theo dõi, nếu HBV ADN > 10^5 copies/ml, tần suất xuất hiện ung thư là 15,3%, ngược lại, tần suất đó chỉ có 2,3% khi HBV ADN < 10^5 copies/ml [10].

Kết quả này một lần nữa làm tăng tính thuyết phục về những nhận định trước đây cho rằng đột biến gen HBX sẽ gây ung thư nhiều hơn có ý nghĩa so với nhóm không đột biến. Nghiên cứu đó tiến hành trên 820 BN VGM và theo dõi sự xuất hiện UTG

trong thời gian 76 tháng. Kết quả cho thấy, tần suất phát triển UTG sau 5 năm và 10 năm lần lượt là 4,4% và 6,3%. Phân tích thống kê bằng phương pháp hồi quy Cox cho thấy đột biến gen HBX là một trong những yếu tố nguy cơ độc lập gây UTG ($p = 0,007$, $RR = 3,66$). Qua đó, người ta tính được độ nhạy và độ đặc hiệu của việc tiên lượng xuất hiện UTG sau 5 năm và 10 năm trên những BN có đột biến này lần lượt là > 84% và > 76% [11]. Một nghiên cứu gần đây cho thấy, nếu có đột biến gen tại điểm đôi A1762T/G1764A, tiên lượng BN sẽ UTG rất cao với độ nhạy > 70% và độ đặc hiệu > 60%. Nếu kết hợp các đột biến gen A1762T/G1764A với các đột biến khác như C1653T và T1753V thì nguy cơ UTG gần như chắc chắn (độ đặc hiệu = 93,9%)...

KẾT LUẬN

Các đột biến gen HBX có xu hướng tăng lên từ nhóm NMVR đến nhóm VGM, tăng cao nhất ở nhóm UTG và có liên quan đến nguy cơ tiến triển thành UTG.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. *Parkin. DM, et al.* Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer.* 2001, 94 (2), pp.153-156.
2. *Ferlay. J, et al.* Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: Globocan 2008. *Int J Cancer.*
3. *Kuo YH, et al.* Hepatocellular carcinoma surveillance and appropriate treatment options improve survival for patients with liver cirrhosis. *Eur J Cancer.* 46 (4), pp.744-751.

4. McClune. AC, MJ Tong. Chronic hepatitis B and hepatocellular carcinoma. Clin Liver Dis. 14 (3), pp.461-476.

5. Hipgrave DB, et al. Hepatitis B infection in rural Vietnam and the implications for a national program of infant immunization. Am J Trop Med Hyg. 2003, 69 (3), pp.288-294.

6. Lok AS, BJ McMahon. Chronic hepatitis B: update 2009. Hepatology. 2009, 50 (3), pp.661-662.

7. Wang SH, et al. Identification of androgen response elements in the enhancer I of hepatitis B virus: a mechanism for sex disparity in chronic hepatitis B. Hepatology, 2009, 50 (5), pp.1392-1402.

8. Song Le. H, et al. Mannose-binding lectin gen polymorphisms and hepatitis B virus infection in Vietnamese patients. Mutat Res. 2003, 522 (1-2), pp.119-125.

9. Chen CH, et al. Clinical significance and evolution of core promoter and precore mutations in HBeAg-positive patients with HBV genotype B and C: a longitudinal study. Liver Int. 2007, 27 (6), pp.806-815.

10. Kumada T, et al. Incidence of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B virus infection who have normal alanine aminotransferase values. J Med Virol. 82 (4), pp.539-545.

Ngày nhận bài: 31/5/2012

Ngày giao phản biện: 26/7/2012

Ngày giao bản thảo in: 31/8/2012

